

ROLE DE L'ACTINE ET DES PROTEINES DU CYTOSQUELETTE DANS LA DIFFERENCIATION MEGACARYOCYTAIRE DES AFFECTIONS MALIGNES DE LA MOELLE OSSEUSE

La production des plaquettes sanguines, la mégacaryocytopoïèse, est l'aboutissement d'une prolifération et d'une différenciation de progéniteurs médullaires (les cellules souches) donnant naissance à des précurseurs polyploïdes (les mégacaryocytes) dont le cytoplasme, après maturation, se fragmente en plaquettes¹. Le contrôle de la mégacaryocytopoïèse est assuré par des facteurs de croissance exerçant une action stimulante ou inhibitrice sur cette hiérarchie de cellules².

Au moment où les auteurs pensaient que ce contrôle s'effectuait sur les cellules-souches, nous avons démontré chez l'animal d'expérience que la stimulation de la prolifération des cellules souches mégacaryocytaires par le lithium n'est pas due à un effet direct de ces molécules mais bien à la sécrétion de facteurs de croissance par les lymphocytes T³. La sécrétion d'acétylcholinestérase par les mégacaryocytes des rongeurs modifie la concentration de l'acétylcholine, un neuromédiateur, et pourrait dès lors jouer un rôle dans la régulation de la production plaquettaire. Cependant, nous avons montré que la stimulation des cellules-souches par les agents cholinergiques découle, comme pour le lithium, d'une augmentation de la production de cytokines non spécifiques par les lymphocytes T⁴.

Aussi, nos efforts se sont logiquement concentrés sur le phénomène de polyploïdisation mégacaryocytaire. Par notre méthode de mesure du contenu en ADN des mégacaryocytes obtenus en culture de moelle osseuse, nous avons confirmé que l'accroissement de la production plaquettaire suite à l'augmentation des besoins en plaquettes ne s'effectue pas au niveau des cellules-souches mais bien à partir des mégacaryocytes dont le niveau de ploïdie est proportionnel aux besoins en plaquettes de l'organisme⁵. Notre technique nous a aussi permis de découvrir un progéniteur mégacaryocytaire de faible densité (Light-Density Colony-Forming-Unit Megakaryocyte; LD-CFU-M) dont la probabilité de polyploïdisation est plus grande que celle des autres cellules-souches⁶.

Dès lors, convaincus de l'importance de la polyploïdisation, nous avons essayé de comprendre ce mécanisme et démontré que l'inhibition de la polymérisation de l'actine, une protéine de structure du cytoplasme, entraîne la polyploïdisation mégacaryocytaire qui permet une augmentation de la production plaquettaire⁷.

Notre projet a pour but de poursuivre l'étude du mécanisme par lequel la modification de polymérisation de l'actine entraîne la polyploïdisation mégacaryocytaire et d'identifier le désordre de ce mécanisme dans les cancers de la moelle osseuse.

1. Chatelain C, Baatout S: Regulation of megakaryocytopoiesis, in "Haematopoietic Growth Factors : From the Basic to Clinical Applications" (Symann M, Quesenberry P, Morstyn G Eds). Gardiner-Caldwell Communications LTD, Cheshire, United Kingdom), pp. 35-44, 1992.
2. Chatelain C, Guillaume T, Symann M: Regulation of megakaryocyte and platelet production. Focus on growth factors 3:1, 1992
3. Chatelain C, Burstein SA, Harker LA: Lithium enhancement of megakaryocytopoiesis in culture: mediation via accessory marrow cells. Blood 62:172, 1983
4. Chatelain C, Hamood M, De Bast M, Symann M: Cholinergic enhancement of megakaryocytopoiesis and granulocytopoiesis in culture: mediation via T-lymphocytes. Exp Hematol 17:1067, 1989
5. Chatelain C, Burstein SA: Fluorescence cytophotometric analysis of megakaryocytic ploidy in culture: studies of normal and thrombocytopenic mice. Blood 64:1193, 1984
6. Chatelain C, De Bast M, Symann M: Identification of a light density murine megakaryocyte progenitor (LD-CFU-M). Blood 72:1187, 1988
7. Chatelain C, De Bast M, Symann M: Enhancement of megakaryocyte polyploidization by actin inhibition. Blood 80:497a, 1992 (abstr.)

2023251770

I. INTRODUCTION.

Les affections malignes de la moelle osseuse se caractérisent par des anomalies de prolifération et de maturation des cellules souches à l'origine des trois lignées des cellules sanguines. La lignée des plaquettes sanguines est issue de cellules de la moelle osseuse, les mégacaryocytes. Ceux-ci tiennent leur nom de la taille importante de leurs noyaux suite à l'acquisition d'un matériel nucléaire polyploïde au cours de la maturation. Dans les leucémies, cancers de la moelle osseuse, les anomalies de la maturation et de la polyploïdisation mégacaryocytaires ainsi que l'action de la chimiothérapie expliquent l'absence de plaquettes fonctionnelles. Comme les plaquettes sanguines sont responsables de l'hémostase primaire, ces patients leucémiques présentent des hémorragies parfois incontrôlables.

La polyploïdisation (endomitose ou endoreduplication) est la règle dans la différenciation normale des mégacaryocytes. Son accentuation assure une augmentation de la production plaquettaire en cas de besoin. En effet, la taille des mégacaryocytes et leur ploïdie augmentent 24 à 48 heures après l'induction d'une thrombopénie chez l'animal. En revanche, l'augmentation provoquée du nombre des plaquettes, par transfusion par exemple, entraîne la diminution de la ploïdie mégacaryocytaire. Il semble que plusieurs substances humérales (IL-6, LIF, IL-11,...) collectivement appelées "thrombopoïétine" exercent une régulation de ce phénomène.

Le mécanisme par lequel s'opère le choix entre la mitose classique et la polyploïdisation est totalement inconnu. Un asynchronisme entre les cinétiques de division nucléaire et cytoplasmique a été invoqué par la plupart des études. Nous avons démontré qu'en conditions contrôlées et stables (cultures de cellules), la cinétique de division nucléaire n'est pas affectée par le type de division mégacaryocytaire (mitose classique ou endomitose). Dès lors, nous avons réfuté l'hypothèse d'une modification de la cinétique de division du noyau dans l'induction du mécanisme de polyploïdisation mégacaryocytaire (1). Les expériences de Paulus, que nous avons confirmées, ont permis d'identifier trois classes de cellules souches mégacaryocytaires en fonction de leurs probabilités (20, 40 et 80%) de quitter la mitose normale pour se polyploïdiser (2,1). Ces travaux ont aussi démontré que les progéniteurs mégacaryocytaires diploïdes ont une probabilité stable d'entrer en endomitose durant plusieurs divisions et que celle-ci change au cours d'une seule mitose. Cela suggère que la polyploïdisation mégacaryocytaire résulte de l'altération soudaine d'un mécanisme biochimique impliqué dans la mitose et dont l'action majeure se développe dans le cytoplasme ou la membrane. Grâce à la méthode de mesure de la ploïdie mégacaryocytaire que nous avons développée (3), nous avons isolé et caractérisé un progéniteur mégacaryocytaire de faible densité (LD-CFU-M) dont les probabilités de polyploïdisation sont limitées à deux classes (4). Ces expériences confortent notre hypothèse d'une modification d'un composant cytoplasmique ou membranaire dans l'endomitose.

La séparation cytoplasmique ou cytodiérèse qui termine la mitose normale n'a pas lieu au cours de l'endomitose. La cytodiérèse débute par la contraction d'un anneau sous-membranaire d'actine-myosine. L'actine, la myosine, et la tubuline sont les composants principaux de la structure de soutien et de motilité de la cellule et forment le cytosquelette. Nous avons donc postulé que les protéines du cytosquelette, composants cytoplasmiques et membranaires, sont responsables de la polyploïdisation. Il est vrai que des cellules embryonnaires de nématodes ont été rendues polyploïdes par inhibition de la formation de l'anneau d'actine-myosine (5). Par ailleurs, le fuseau de tubuline détermine le plan de clivage cellulaire et donc l'orientation de l'anneau d'actine-myosine (6,7).

2023251771

Récemment, nous avons montré chez la souris, que la cytochalasine B, un inhibiteur de la polymérisation de l'actine, ajoutée aux cultures des progéniteurs mégacaryocytaires augmentait la ploïdie moyenne des mégacaryocytes au sein des colonies (8). Par contre, la colchicine, un inhibiteur de la polymérisation de la tubuline n'a pas cet effet. Les techniques de mesure de la ploïdie mégacaryocytaire en culture ne donnent pas de résultats reproductibles chez l'homme. Aussi nous avons adopté et modifié une méthode de cytofluorométrie en flux de la ploïdie mégacaryocytaire pour étudier des lignées de cellules cancéreuses à caractère mégacaryocytaire. L'addition d'esters de phorbol (stimulants non spécifiques) et/ou de cytochalasine B (inhibiteur de la polymérisation de l'actine) aux milieux de culture de certaines lignées humaines (DAMI, HEL, K 562 et MEG 01), entraînent une augmentation significative de l'endomitose mégacaryocytaire. Il semble donc que l'absence de polymérisation de l'actine soit nécessaire à l'augmentation de ploïdie des mégacaryocytes. Ceci pourrait être expliqué par l'absence de formation en télophase de l'anneau contractile d'actine-myosine qui mène habituellement à la séparation cytoplasmique. Comme la concentration de l'actine au sein de la cellule est constante, il est évident qu'au cours de la division cellulaire, la synthèse d'actine nouvelle au sein d'une cellule est un phénomène contrôlé.

Comment envisager le rôle de l'actine dans le phénomène de polyploïdisation? Nous savons que les esters de phorbols (en particulier, le phorbol myristate acétate ou PMA) agissent sur la cellule en stimulant des récepteurs de manière non spécifique. L'activation de ces récepteurs dont le cytosquelette est partie intégrante peut amener diverses réactions inhibitrices ou stimulantes au sein de la cellule. Comme la réponse de la cellule suite à l'action du PMA n'est pas aussi importante que celle produite par la cytochalasine B, nous pensons que l'augmentation de ploïdie par la cytochalasine B doit être expliquée par l'action maximale sur un mécanisme effecteur terminal partiellement modulable par les récepteurs aux diverses cytokines.

Par quel mécanisme, le besoin accru en plaquettes et dès lors l'engagement dans le phénomène de polyploïdisation mégacaryocytaire peuvent mener à la diminution de polymérisation de l'actine? Tout d'abord, l'expression génique de l'actine, si elle est contrôlée devrait logiquement dépendre du produit final sous l'une ou l'autre de ses formes (actine G et/ou actine F). Toute modification d'un des composants (actine F) pourrait modifier la synthèse finale d'actine. Ensuite, la thymosine B4 a la propriété de séquestrer la majorité de l'actine G soluble (9). Elle peut donc moduler l'équilibre entre formes soluble et polymérisée de l'actine qui serait responsable du maintien d'une division mitotique normale. Enfin, le type particulier de polymérisation de l'actine pourrait aussi intervenir dans ce phénomène. En effet, la polymérisation peut être schématisée comme une lente progression d'une extrémité (arrow) du filament d'actine F où les monomères d'actine viennent se lier par rapport à l'autre extrémité (tail) dont les monomères d'actine se détachent. Donc, avec un équilibre F/G conservé, le type chimique d'actine peut encore être chimiquement modifié par ce processus dynamique au sein de la molécule déjà polymérisée.

II. BUT DU TRAVAIL.

Notre projet a pour but d'une part de préciser le mécanisme par lequel la modification de polymérisation de l'actine dans le cytoplasme engendre l'endomitose mégacaryocytaire et d'autre part de déceler, dans certains cancers de la moelle osseuse où la mégacaryocytopoïèse est déficiente, les anomalies du métabolisme des protéines du cytosquelette.

2023251772

III. APPROCHE EXPERIMENTALE.

A. ETABLISSEMENT DE LIGNEES MEGACARYOCYTAIRES HUMAINES.

Nous avons pu obtenir des lignées continues de cellules mégacaryocytaires leucémiques (DAMI, MEG01, HEL, K562). Notre laboratoire a développé quatre nouvelles lignées à partir d'affections malignes de la moelle osseuse (2 de Leucémie Myéloïde Chronique et deux de Thrombocytemie Essentielle). Ces lignées doivent encore être caractérisées. En particulier, leurs quantités mégacaryocytaires (expression des glycoprotéines IIb/IIIa et Ib) à l'état basal et après stimulation par PMA seront étudiées par cytofluorométrie en flux.

B. ETUDE DE LA CONCENTRATION D'ACTINE INTRACELLULAIRE.

1. MESURE GLOBALE AU CYTOFLUOROMETRE EN FLUX.

La concentration intracellulaire d'actine sera estimée par cytofluorométrie en flux (FACSscan). Nous avons pu établir la mesure de l'actine intracytoplasmique de populations lymphocytaires d'anticorps monoclonaux couplés à la fluorescéine. Ce fluorochrome émettant une lumière verte après excitation dans l'ultraviolet permet la mesure concomitante de la ploïdie par l'iodure de propidium qui, avec la même fréquence d'excitation émet une lumière rouge. Nous étudierons la concentration d'actine dans les cellules des lignées cancéreuses à composante mégacaryocytaire. Nous corrélerons cette concentration à la ploïdie de chaque cellule. Trois possibilités peuvent être envisagées. Tout d'abord, la découverte d'une absence d'augmentation de la concentration d'actine au cours de l'endomitose suggérerait que, globalement, la plus grande partie de l'actine est impliquée dans le phénomène d'endomitose. Par contre, une augmentation progressive ou une augmentation "saltatoire" suggèreraient qu'une faible partie seulement de l'actine serait impliquée dans l'endoréplication.

La distribution de l'actine des mégacaryocytes provenant de la moelle osseuse de donneurs de greffe permettra de tester notre hypothèse au cours de la régulation physiologique de cellules mégacaryocytaires normales.

2. MESURE QUANTITATIVE DE L'ACTINE G ET F PAR "CELL SORTER".

L'actine se présente sous deux formes : monomère soluble (actine G) ou polymère insoluble (actine F). Les monomères d'actine sont très hétérogènes et se caractérisent surtout par les sites de liaison aux ligands (par exemple la gelsoline et la profiline pour la structure; la myosine pour la motilité et l'ATP pour apporter l'énergie contractile). Malgré cette hétérogénéité qui définit les fonctions de l'actine polymérisée, la concentration d'actine est relativement constante dans toutes les cellules. C'est d'ailleurs pour cette raison qu'elle a été utilisée comme contrôle de l'expression génique d'autres molécules. Quelques anticorps monoclonaux reconnaissent différents épitopes de l'actine. Malheureusement, ils ne permettent pas de détecter réellement les sites de réaction des ligands et dès lors ne permettent pas de mesurer les différents types d'actine. Aussi, en marquant par exemple en fluorescence les ligands eux-mêmes, nous pourrions déterminer dans l'endomitose, le type chimique d'actine en cause et, par conséquent la fonction perturbée (structure, motilité ou énergie). Par ailleurs, comme nous l'avons expliqué, la forme F est en constant renouvellement par la synthèse en "arrow" et la destruction en "tail". Le contrôle de ce phénomène dynamique est encore mal connu mais peut être étudié grâce à la phalloïdine dont la propriété est de se fixer spécifiquement à une extrémité de la molécule polymérisée et de bloquer définitivement la polymérisation. La phalloïdine peut facilement être couplée à une molécule fluorescente.

2023251773

Dès lors, pour mettre en évidence le type précis d'actine impliqué dans la polyploïdisation, nous emploierons le tri cellulaire au cytofluoromètre (COULTER ELITE) des cellules des lignées ainsi que des cellules normales. Nous avons déjà réalisé la séparation de mégacaryocytes en diverses phases endomitotiques (2N versus >2N). Nous pourrions ainsi déterminer par électrophorèse des extraits de cellules triées en classes de ploïdie, les modifications qualitatives et quantitatives de l'actine. Ceci sera aussi réalisé sur les lignées mégacaryocytaires après stimulation par les esters du phorbol et par des cytokines telles que l'interleukine-6.

C. DETERMINATION DES ANOMALIES DE LA MATURATION MEGACARYOCYTAIRE DANS LES AFFECTIONS MALIGNES DE LA MOELLE OSSEUSE.

Par les techniques mises au point sur les lignées cellulaires et décrites plus haut, nous étudierons au fur et à mesure des pathologies rencontrées en clinique, le rôle de l'actine dans la régulation anormale des leucémies et états apparentés. Nous focaliserons nos efforts sur l'étude de la polyploïdisation classiquement décrite dans les syndromes myéloprolifératifs tels que la polyglobulie de Vaquez et la thrombocythémie essentielle et dans les pathologies cancéreuses de l'hématopoïèse (Leucémies aiguës à caractère mégacaryocytaire).

REFERENCES

1. Chatelain, C., De Bast, M., Symann, M.: Properties of LD-CFU-M support the hypothesis of a random development of megakaryocyte ploidy from a multicompartmental stem cell system. *Blood* 72, 82a, 1988(Abstract)
2. Paulus, J.M., Prenant, M., Deschamps, J.F., Henry Amar, M.: Polyploid megakaryocytes develop randomly from a multicompartmental system of committed progenitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 4410-4414, 1982
3. Chatelain, C., Burstein, S.A.: Fluorescence cytophotometric analysis of megakaryocytic ploidy in culture: studies of normal and thrombocytopenic mice. *Blood* 64, 1193-1199, 1984
4. Chatelain, C., De Bast, M., Symann, M.: Identification of a light density murine megakaryocyte progenitor (LD-CFU-M). *Blood* 72, 1187-1192, 1988
5. Laufer, J.S., von Ehrenstein, G.: Nematode development after removal of egg cytoplasm: absence of localized unbound determinants. *Science* 211, 402-405, 1981
6. Beams, H.W., Kessel, R.G.: Cytokinesis: a comparative study of cytoplasmic division in animal cells. *Am. Sci.* 64, 279-290, 1976
7. Blose, S.H.: Ten-nanometer filaments and mitosis: maintenance of structural continuity in dividing endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 3372-3376, 1979
8. Chatelain, C., De Bast, M., Symann, M.: Enhancement of megakaryocyte polyploidization by actin inhibition. *Blood* 80, 497a, 1992(Abstract)
9. Cassimeris, L., Safer, D., Nachmias, V.T., Zigmond, S.H.: Thymosin β_4 sequesters the majority of G-actin in resting human polymorphonuclear leukocytes. *J. Cell Biol.* 119, 1261-1270, 1992

2023251774